

10/584303

31

10/584303

ANTICANCER AGENT CONTAINING LK8 PROTEIN AS EFFECTIVE INGREDIENT

Abstract:

PURPOSE: An anticancer agent containing protein corresponding to kringle KV38 of apolipoprotein(LK8 protein) as an effective ingredient is provided. The LK8 protein has inhibitory capacity against metastasis of cancer cells when systemically administered and an inhibitory effect on the growth of human carcinoma and thus can be used as a cancer metastasis suppressing agent or a therapeutic agent for a primary tumor. **CONSTITUTION:** An anticancer agent includes LK8 protein described in a sequence number 1. The effective amount of the LK8 protein is 1 to 50mg/kg. Dosing one to four times a day is particularly preferred. It was showed that systemic administration of LK68 causes the inhibition of primary tumor growth, which is correlated with a suppression of tumor-induced angiogenesis. The primary tumor is human prostatic carcinoma and lung carcinoma.

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
A61K 38/16

(11) 공개번호
(43) 공개일자

10-2004-0075270
2004년08월27일

(21) 출원번호 10-2003-0010797
(22) 출원일자 2003년02월20일

(71) 출원인 재단법인 목암생명공학연구소
경기 용인시 구성읍 보정리 341번지

(72) 발명자 유현경
경기도수원시권선구당수동439

김장성
경기도수원시팔달구당포동690번지망포마을동수원LG빌리지201동103호

안진형
경기도용인시수지읍풍덕천동660-5304호

이호정
경기도용인시수지읍동천마을현대2차홈타운202동1602호

강관엽
경기도의정부시신곡동723-1삼익아파트105동1804호

임형권
경기도성남시분당구구마동88차치마을202동1002호

김원경
경기도수원시팔달구원천동원천주공APT108동903호

임인환
서울특별시서초구방배동436-23

김성근
경기도수원시팔달구우만동300번지주공아파트401동1004호

우성환
경기도수원시팔달구영통동신나무실주공5단지514동903호

주학규
경기도용인시기흥읍신갈리2-1번지동보아파트가동302호

이지현
경기도용인시수지읍풍덕천2동용인동보아파트101동1902호

정수일
경기도용인시수지읍성북동LG빌리지204동1103호

윤엽
경기도과천시중앙동주공APT104동103호

정경환
서울특별시송파구오금동대림APT2동807호

박두홍
서울특별시서초구방배동2754-3

(74) 대리인 이원희

심사상구 : 있음

(54) LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제

요약

본 발명은 서열번호 1로 기재되는 LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제에 관한 것이다. 본 발명의 LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제는 종양의 성장 및 전이를 억제하는 효능을 가지므로, 암 전이 억제제 또는 원발 종양의 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 AOX1 프로모터와 AOX1 터미네이터 사이에 LK8 cDNA(261 bp)가 삽입된 LK8 유전자의 발현벡터인 pMB RI-LK8(8.25 kb)의 개략지도이고,

도 2는 마우스 흑색종(melanoma)인 B16F10 세포를 마우스(C57BL/6)의 꼬리정맥으로 이식했을 때, 상기 마우스 흑색종 세포들의 전이가 LK8 단백질의 처리로 억제되는 것을 나타내는 사진 및 그래프이고,

(a) PBS만을 처리한 마우스의 폐,

(b) 1 mg/kg의 LK8 단백질을 처리한 마우스의 폐 사진,

(c) LK8 단백질 처리에 의해 B16F10 세포의 폐로의 전이가 억제된 것을 나타낸 그래프

도 3은 인간 전립선 암종인 PC-3 세포를 이식한 마우스에 LK8 단백질을 투여 후 결과일에 따른 종양 크기의 변화를 나타낸 그래프이고,

도 4는 인간 폐암종인 A549 세포를 이식한 마우스에 LK8 단백질을 투여 후 결과일에 따른 종양 크기의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 특정 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 아프로피단백질(a)의 크링글(kringle) KV38에 해당하는 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제에 관한 것이다.

중양은 비정상적이고 비제어성이며 무질서한 세포증식의 산물이다. 이러한 종양이 파괴적인 성장성, 침습성 및 전이성이 있다면 악성으로 분류된다. 침습성이란 주위 조직을 침윤 또는 파괴하는 성질로서, 일반적으로 조직의 경계를 이루는 기저층을 파괴시켜 종양이 국부적으로 전파되는 것을 의미하며, 종종 체내의 순환계로도 유입된다. 전이란 일반적으로 림프관(lymphatic) 또는 혈관에 의해 원발 위치와는 다른 곳으로 종양 세포가 퍼지는 것을 의미한다. 전이는 또한 장악성 재발 또는 다른 공간을 통해 직접 신장하여 종양 세포를 이동시키는 것을 의미하기도 한다.

현재, 암은 주로 3가지 치료법, 즉 외과적인 수술, 방사선조사 및 화학요법 중 1가지 또는 이들의 조합을 통해 치료되고 있다. 수술은 질병 조직을 대부분 제거하는 것을 포함한다. 이러한 외과적 수술은 특정 부위, 예컨대 유방, 결장 및 피부에 위치한 종양을 제거하는 데에는 효과적이지만, 척추와 같이 일부 구역에 있는 종양을 치료하거나 백혈병과 같은 분산성 종양 질환을 치료하는 데는 사용할 수 없다.

화학요법은 세포 복제 또는 세포 대사를 방해시키며, 흔히 유방, 폐 및 정소의 암을 치료하는데 많이 사용되는데, 중앙 질병을 치료하는데 사용되는 전신성 화학요법의 부작용은 암 치료를 받는 환자들에게 가장 문제가 된다. 이러한 부작용 중에서도 멀미와 구토는 가장 일반적이며 심각한 부작용이다. 화학요법에 의한 부작용은 환자의 생명을 더 많은 영향을 미치며 치료에 대한 환자의 순응성을 급격하게 변화시킬 수 있다. 또한, 화학치료제와 관련된 부작용으로는 일반적으로 이러한 약물의 투여시 주의해야 하는 유용량 제한 독성(DLT)이 있다. 예를 들어, 집막염은 여러 항암제, 예컨대 항대사물질 세포독소제인 5-플루오로우라실, 메토틱세이트 및 항종양 항생제(예, 독소루비신) 등에 대한 유용량 제한 독성이다. 이러한 화학요법 유래의 부작용 중 대부분은 심한 경우 입원을 요하거나, 통증을 치료하기 위해 진통제를 필요로 하기도 한다. 이와 같이 화학치료제 및 방사선 치료에 의한 부작용들은 암 환자의 일상적 처치시 주요 문제가 되고 있다.

따라서 화학요법 치료제의 부작용을 감소시킬 수 있는 생물체로부터 유래한 물질을 이용한 항암제의 개발이 시급한 실정이다. 특히 생물체에서 생성된 물질 중에서 암세포에 직접 작용하기보다는 암세포의 성장을 돕는 다양한 내피세포에 작용함으로써 암세포의 성장을 차단하여 항암제로 이용이 기대되는 물질이 있다. 상기 물질을 이용한 항암제는 단순한 암 치료뿐만 아니라 암 전이를 차단할 수 있는 기능도 가지고 있다.

크링글(kringle)은 약 80개의 아미노산과 세 개의 분자내 이황화 결합으로 구성된 단백질의 구조영역이다. 크링글 구조는 프로트롬빈(Walz, D.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:1069-1073, 1977), 유로키나제(Pennica, D. *et al.*, *Nature*, 301:579-582, 1983), 간세포 성장인자(Lukker, N. A. *et al.*, *Protein Eng.*, 7:895-903, 1994) 및 아포리포단백질(a)(apolipoprotein(a); 이하, '아포(a)'로 약칭함)(McLean, J.W. *et al.*, *Nature*, 330:132-137, 1987) 등과 같은 다수의 단백질에서 발견된다. 크링글 영역은 독립적인 접힘 단위(folding unit)로 구성되며 그와 기능적인 역할은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

아포(a)는 두 종류의 크링글 영역인 KIV 및 KV와 비활성의 단백질 분해효소-유사(protease-like) 영역을 포함하고 있다. KIV 크링글 영역은 아미노산 서열의 상동성에 의해 10종의 아형(subtype: KIV-1 내지 KIV-10)으로 나뉘며, 아포(a) 유전자의 다양한 인간 대립유전자에 15 내지 40개의 복제수(copy number)로 존재한다. 아포(a)는 저밀도 리포단백질(LDL)의 주요 단백질 성분인 아포 B-100과 공유적으로 결합하여, 리포단백질(a)(Lipoprotein(a), 이하 'Lp(a)'로 약칭함)를 형성하며(Fless, G.M., *J. Biol. Chem.*, 261:8712-8717, 1986), Lp(a)의 세포질내 농도 증가는 단독으로도 동맥경화(Artherosclerosis)의 주요 위험요소가 된다(Armstrong, V.W. *et al.*, *Artherosclerosis*, 62:249-257, 1986; Assmann, G., *Am. J. Cardiol.*, 77:1179-1184, 1996).

이에, 본 발명자들은 동맥경화와 암의 성장이 혈관신생에 의존적이라는 사실에 근거하여 인간 아포(a) 크링글 중의 하나인 KV38의 항암 활성에 대하여 연구한 결과, 상기 단백질이 암세포의 성장에 필수적인 bFGF와 같은 내인성 성장인자에 의한 혈관신생을 억제할 수 있어 항암제로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 인간 아포(a) 크링글 KV38(이하, 'LK8 단백질'이라 함)을 유효성분으로 포함하는 항암제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암제를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 항암제는 서열번호 1 로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하며, 암 전이 억제제로 사용되는 것이 바람직하고, 원발 종양을 치료하는데 사용되는 것이 더욱 바람직하며, 전립선 암종 또는 폐암종을 치료하는데 사용되는 것이 가장 바람직하다.

본 발명의 항암제에 있어서, LK8 단백질의 유효용량은 0.1 내지 100 mg/kg 인 것이 바람직하고, 1 내지 50 mg/kg 인 것이 더욱 바람직하며, 하루 1 ~ 4 회 투여될 수 있다. 그러나, 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태, 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

본 발명에 있어서, 'KV38'은 아포(a)의 크링글을 의미하고, 'LK8'은 KV38의 제조합 단백질을 의미하지만, 특별히 상기와 같이 구체적으로 한정하지 않는 한 일반적으로는 KV38 및 제조합 LK8 단백질을 모두 LK8 단백질로 통칭하여 사용한다.

본 발명에 있어서, LK8 단백질은 아포(a) 크링글 영역 중 KV38 크링글에 해당하는 부위로서 시험관내 조건(*in vitro*) 및 생체내 조건(*in vivo*)에서 혈관내피세포의 활성을 억제하여 종양세포의 증식, 전이 및 분화를 억제하는 효과를 나타낸다. 본 발명의 바람직한 실시예에 기재된 바와 같이, LK8 단백질을 전신투여하면 원발성 종양의 성장이 억제되고, 암세포의 전이에 있어서도 상당한 억제효과가 있다(도 2 내지 도 4 참조). 따라서, 본 발명의 LK8 단백질은 종양의 성장과 전이를 억제할 수 있으므로, 원발 종양의 치료 및 암 전이 억제제로 유용하게 사용될 수 있다.

한편, 본 발명의 LK8 단백질은 기존에 사용하던 항암화학요법이나 방사선 요법과 병용하였을 경우 상승효과를 발휘할 것으로 기대된다. 예를 들면, 1차적 종양을 파괴하는데 사용되는 방사선 치료시에 본 발명의 LK8 단백질을 병용하여 처리할 경우에 암의 전이가 보다 효과적으로 억제될 수 있다. 기존의 화학항암요법의 경우, 다양한 화학항암제 투여에 따른 독성이 제일 큰 문제점으로 지적되고, 본 발명의 LK8 단백질과 병용할 경우 독성이 없을 만큼 소량의 화학항암제를 투여하였을 경우에도 그 항암효과는 현저히 증가하는 결과를 보일 것으로 기대된다.

즉, 종양의 경우에 종래의 외과적 수술, 방사선치료 또는 화학치료, 면역치료 등에 LK8 단백질을 병용함으로써 그 치료효능을 극대화하고, 계속적으로 LK8 단백질을 투여함으로써 미세전이의 휴지(dormancy)를 연장시키고, 원발성 종양의 성장을 억제 및 안정화시킬 수 있다. 또한, 많은 항암제들은 제제의 특성상 장기간 환자에게 투여되어야 하기 때문에 단백질의 생산 및 생산된 단백질의 높은 단가 등 여러 가지 어려운 점이 발생하게 된다. 이러한 단점을 극복할 수 있는 대체방안의 하나로 유전자 치료법이 대두되고 있으며, LK8 단백질의 경우에 있어서도 유전자 치료 방법의 도입을 통하여 항암제 또는 암전이 억제제의 효능을 극대화할 수 있는 많은 가능성이 있다.

본 발명의 LK8 단백질을 포함하는 항암제는 임상투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

즉, 본 발명의 항암제는 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 충량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 경제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 LK8 단백질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 슈크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 펠라린 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방한제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액제, 현탁액, 유제, 동결건조제, 좌각제 포함된다. 비수용성액, 현탁용액제 또는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌액의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

상기 LK8 단백질을 정맥 투여 최소치사량(LD₅₀)이 약 1,000 mg/kg인 안전한 물질이므로, 본 발명의 항암제는 안전한 물질로 판단된다(표 2 참조).

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> LK8 단백질의 제조

<1-1> LK8 발현벡터 pMBRI-LK8의 제조

본 발명자들은 LK8 단백질을 효율적으로 제조하기 위하여, 먼저 LK8 발현벡터를 제조하였다.

LK8 유전자를 발현하기 위한 기본벡터로 pPIC9 벡터(8.0 kb, Invitrogen, Netherland)를 이용하였다. pPIC9 발현벡터의 개질지도를 살펴보면, 메탄올에 의한 높은 발현을 가능하게 해주는 프로모터 AOX1과 발현된 단백질의 분비를 가능하게 해주는 α -인자 분비신호(α -factor secretion signal), 전사의 효과적인 종결과 폴리아데닐레이션(polyadenylation)을 가능하게 해주는 AOX1의 폴리아데닐레이션 신호(polyadenylation signal)인 3'AOX1(TT) 및 상기 균주의 형질전환체의 표시마커(selectable marker)로써 효모인 아생형 파이키아 파스트리스의 히스티딘을 탈수소효소(histidinol dehydrogenase)를 암호화하는 DNA 단편을 일련의 순서로 포함하고 있다.

먼저, pET15b/LK8(PCT/KR99/00554 참조)을 주형(template)으로 사용하여 서열번호 2 로 기재되는 LK8N-XhoI 및 서열번호 3 로 기재되는 LK8C-EcoRI 프라이머로 LK8 유전자를 PCR로 대량증폭하고, 이를 제한효소 *Xho*I과 *Eco*RI로 절단한 후 동일한 방법으로 제한효소 절단을 수행한 pPIC9 벡터에 삽입하는 서브클로닝(subcloning)을 수행하여, LK8 유전자의 최종발현벡터인 pMBRI-LK8(8.25 kb)을 제조하였다(도 1).

<1-2> pMBRI-LK8이 도입된 형질전환체의 제조

제조합 형질전환체를 제작하기 위한 숙주로는 메탄올 자화 효모인 파이키아 파스트리스를 이용하였다.

구체적으로, LK8 유전자의 발현벡터인 상기 pMBRI-LK8을 *Sac*I 제한효소로 처리하여 선형화 시킨 후 상기 숙주 균주 염색체의 AOX1 유전자 내로 상동재조합(homologous recombination)을 이용하여 삽입시켰다. 이때, 형질전환은 일렉트로포레이션(electroporation) 방법으로 실시하였으며, 제조합 효모 형질전환체는 히스티딘(Histidine) 결손 배지에서 콜로니의 형성이부러 선별하였고, 상기 선별된 제조합 형질전환체의 염색체 내 AOX1 부위로 LK8 cDNA가 삽입되었음을 PCR을 통하여 확인하였다. 또한, 상기 제조합 형질전환체의 배양 및 메탄올로 발현을 유도함으로써 LK8 유전자의 발현 여부를 관찰한 결과, LK8 유전자가 발현되어 상기 단백질이 배양배지로 대량으로 분비되었음을 확인하였다.

이때, 상기 분리된 본 발명의 LK8 단백질은 서열번호 1 로 기재되는 아미노산 서열로 구성된다.

<1-3> 제조합 균주의 배양

<1-3-1> 종균배양

본 발명에서는 먼저 파이키아 파스트리스에 LK8 유전자를 도입한 제조합 균주를 구축하고 이로부터 24시간 동안 적절한 균체량과 활성도(20배로 희석시켰을 때, OD 600 nm = 0.8 내지 1.2)를 얻어낼 수 있도록 종균배양시켰다.

종균배양은 YDP 배지(1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 덱스트로오스)에서 24시간의 진탕배양을 통하여 수행하였다. 발효조는 75 L 규모의 발효조를 사용하였고, 초기 시작 배지는 20 L이었으며 유가배양(fed-batch culture) 방법에 의하여 최종 배양액 부피가 약 40 L가 되도록 고농도배양을 수행하였다.

<1-3-2> 본배양

상기 YPD 배지에서 종균배양을 수행한 후, 초기 시작배지의 30%에 해당하는 종균 배양액을 접종하여 본배양을 수행하였다. 하기 표 1 의 조성을 가지는 발효조에서 본 배양을 수행하였으며, 메탄올 공급으로 인하여 발효액의 부피가 초과되어 더 이상 발효를 수행할 수 없을 때, LK8 단백질의 생산을 위하여 10% 이상의 발효액을 회수하고, 메탄올의 공급을 계속함으로써 발현을 지속적으로 유도하였고, 이 단계를 반복함으로써 계속하여 LK8 단백질을 생산할 수 있었다. 상기 과정 중 탄소원의 소비 속도는 세포의 양에 비례하기 때문에 발효액의 일부를 회수할 때, 메탄올의 공급속도를 용존산소량을 기증관에서 $\pm 20\%$ 이상 벗어나지 않도록 하는 메탄올 공급 방식을 통하여 메탄올의 공급속도를 자동조절하였고, 상기 배양 과정을 수회 반복함으로써 분리된 LK8 단백질을 발효 200시간 이상 동안 1 L의 배양액 당 250 mg 이상을 얻을 수 있었다

[표 1]

| 배지의 종류 | 성분 | 농도 |
|--------------|---------------------------------------|---------|
| 본배양 배지 | 메탄올 | 500 g/L |
| | 미량금속용액 | 8 mL/L |
| 미량금속용액의 배지조성 | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 4 g/L |
| | KI | 0.3 g/L |

| | |
|---------------------------------------|----------|
| MnSO ₄ · H ₂ O | 4 g/L |
| NaMoO ₄ · H ₂ O | 0.1 g/L |
| H ₃ BO ₄ | 0.01 g/L |
| CoCl ₂ | 0.1 g/L |
| ZnCl ₂ | 3 g/L |
| FeSO ₄ · H ₂ O | 10 g/L |
| 바이오틴 | 0.1 g/L |
| H ₂ SO ₄ | 5 mL/L |

<실시예 2> B16F10 세포의 정맥내 투여에 의한 폐로의 전이 실험

C57BL/6 마우스(Charles River Japan, Inc.)의 꼬리정맥에 마우스 흑색종(melanoma)인 B16F10 세포(이하, '흑색 종 세포'로 약칭함)(American Type Culture Collection)를 1.8×10^5 개 이식하고, 그 다음날부터 14일 동안 하루에 두 번씩(1 mg/kg/day, 0.2 mg/kg/day 농도) 상기 실시예 1에서 제조된 LK8 단백질을 피하로 투여하였다. 이때, LK8 단백질 대신에 PBS를 투여한 그룹을 대조군으로 설정하였다. 세포를 이식한지 13일 채 되는 날에 마우스를 해부하여 폐를 적출하고 전이된 암세포(흑색 종 세포)의 콜로니 수를 계속하였다.

그 결과, PBS를 투여한 마우스 그룹에서는 흑색 종 세포가 전이되어 폐에 커다란 콜로니들이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(도 2의 a). 반면에 LK8 단백질을 투여한 마우스 그룹에서는 흑색 종 세포의 전이로 생성된 콜로니의 수가 현저하게 줄어들었으며, 그 크기 또한 줄어든 것을 관찰할 수 있었다(도 2의 b). 구 체적으로, 1 mg/kg의 LK8 단백질 처리시에 대조군에 비하여 53% 정도의 암세포 전이 억제효과가 있는 것으로 나타났다(도 2의 c).

<실시예 3> 원발 종양의 성장 억제

모세혈관 생성에 대한 LK8 단백질의 생체내에서의 효과를 관찰하기 위하여 이중 이식된 종양 모델을 사용하였다. 관련된 모든 실험은 4주된 무작위 교배계 암컷 Balb/c nu/nu 누드마우스(Charles River Japan, Inc.)를 사용하여 수행하였으며 멸균조건에서 생육하였다.

<3-1> 인간 전립선 암종(PC-3)

인간 전립선 암종인 PC-3 세포(American Type Culture Collection)를 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지(GIBCOTM, Invitrogen Corporation)에서 배양하였고, 상기 PC-3 세포 약 5×10^6 개를 누드마우스의 등쪽 근위 중앙부에 피하 접종하였다. 상기 종양이 이식된 후 정확히 10일을 경과하였을 때, 50 mg/kg/day의 LK8 단백질을 투여하였다. 이때, LK8 단백질 대신에 PBS만 투여한 그룹을 대조군으로 설정하였다. 처리 과정은 50일간 계속되었으며, 그 이후에 종양의 크기를 3 내지 4일에 한 번씩 측정하였다. 그 결과, LK8 단백질 처리에 의하여 종양의 성장이 저하되었는데, 대조군에 비하여 63% 정도의 종양성장 억제 효과가 관측되었다(도 3).

<3-2> 인간 폐암종(A549)

인간 폐암종인 A549 세포(American Type Culture Collection)를 10% FBS가 첨가된 DMEM(GIBCOTM, Invitrogen Corporation) 배지에서 배양하였고, 상기 종양 세포 1×10^7 개를 누드마우스의 등쪽 근위 중앙부에 피하 접종하였다. 상기 종양이 이식된 후 정확히 5일을 경과하였을 때, 50 mg/kg/day의 LK8 단백질을 투여하였다. 이때, LK8 단백질 대신에 PBS만 투여한 그룹을 대조군으로 설정하였다. 처리 과정은 46일간 계속되었으며, 그 이후에 종양의 크기를 3 내지 4일에 한 번씩 측정하였다. 그 결과, LK8 단백질 처리에 의하여 종양의 성장이 저하되었는데, 대조군에 비하여 61% 정도의 종양성장 억제 효과가 관측되었다(도 4).

<실시예 4> LK8 단백질의 급성독성 시험

5주령의 특정병원부재(SPF) SD(Sprague Dawley)계 랫트를 사용하여 급성독성 실험을 실시하였다. 5가지 군으로 설정한 랫트에 각각 260 mg/kg, 364 mg/kg, 510 mg/kg, 714 mg/kg 및 1000 mg/kg의 용량으로 본 발명의 LK8 단백질을 각각 당 5 마리의씩 단회 정맥 투여하였다(표 2). 시험 물질인 LK8 단백질을 투여 후, 14일의 경과시까지 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강강기와 흉강강기의 이상여부를 관찰하였다. 시험 결과, 1000 mg/kg의 LK8 단백질의 투여에서는 일부의 독성이 확 인되었으나, 시험 물질을 투여한 대부분의 랫트에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화,

혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 실험된 LK8 단백질은 10 00 mg/kg까지는 비교적 안전한 물질로 판단되며, 정맥 투여 최소치사량(LD₅₀)은 1000 mg/kg인 안전한 물질로 판단되었다(표 2).

[표 2]

[표 2]

| 투여량 (mg/kg) | 총 사망 랫트 수/시험 랫트 수 | LK 8 단백질 투여 후 경과일 | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 260 | 0/5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 364 | 0/5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 510 | 0/5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 714 | 0/5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 3/5 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, LK8 단백질은 전신 투여시에 암 세포의 전이 억제능이 있으며, 또한 인간 전립선 암종 및 폐암종의 성장 억제 효과가 있으므로, LK8 단백질을 포함하는 본 발명의 함암제는 암 전이 억제제 또는 원발 종양의 치료제로 유용하게 사용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1 로 기재되는 LK8 단백질을 유효성분으로 포함하는 함암제.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 LK8 단백질의 유효용량은 0.1 내지 100 mg/kg인 것을 특징으로 하는 함암제.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 LK8 단백질의 유효용량은 1 내지 50 mg/kg인 것을 특징으로 하는 함암제.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 암 전이 억제에 사용되는 것을 특징으로 하는 함암제.

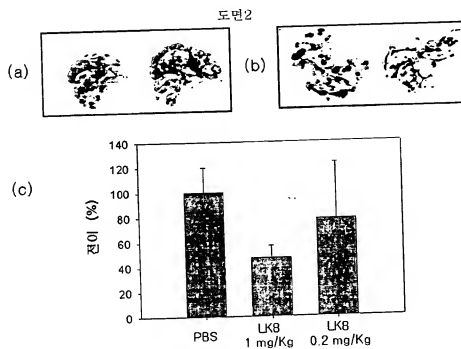
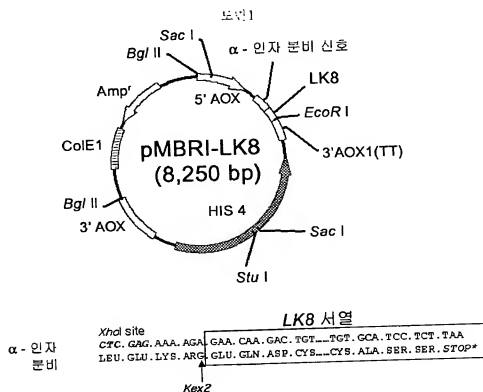
청구항 5.

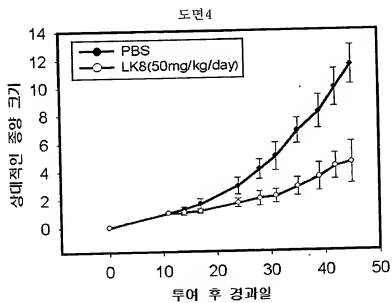
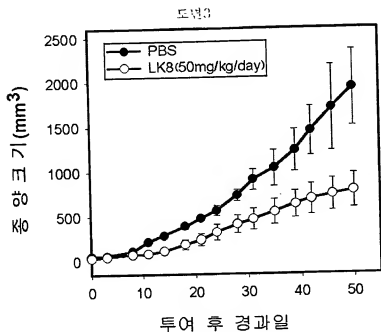
제 1항에 있어서, 원발 종양의 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 함암제.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 원발 종양은 전립선 암종 또는 폐암종인 것을 특징으로 하는 함암제.

도면





- <110> MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE
- <120> Anticancer agent comprising LK8 protein as an active ingredient
- <130> 2p-11-19
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 75
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 20 25 30
 His Ser Thr Phe Ile Pro Gly Thr Asn Lys Trp Ala Gly Leu Glu Lys
 35 40 45
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ile Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
 50 55 60
 Thr Met Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys
 65 70 75

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LK8N-XhoI primer

<400> 2

tcgcctcgag aaaagagaac aagactgtat gttt

34

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LK8C-EcoRI primer

<400> 3

cgaattctta agaggatgca cagagagggg t

31